R. ISTITUTO SUPERIORE AGRARIO DI PISA

LABORATORI DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI BATTERIOLOGIA AGRARIA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

42.

O. VERONA E E. BAGNOLI

Aspergillosi delle Cariossidi di Mais

Estratto dal *Bollettino del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa,*

Volume VII - Anno 1931.

PISA: TIP. EDITRICE PACINI MARIOTTI 1931 (X)

EMILIO PACINI, Successore

O. VERONA e E. BAGNOLI

Aspergillosi delle Cariossidi di Mais

V.

O. VERONA e E. BAGNOLI

Aspergillosi delle Cariossidi di Mais

(*Giunta il 15 luglio 1931*)

Nel campo di prova del Laboratorio di Patologia Vegetale di questo Istituto furono coltivate a scopo sperimentale, durante l'anno agrario 1928-29, alcune parcelle seminate a granturco.

Il prodotto — sano, sebbene non abbondante per la siccità incontrata durante il periodo estivo — raccolto, fu messo al riparo in un magazzeno molto aperto ma un poco umido. Iniziatasi verso la fine di ottobre la sgranatura delle pannocchie, ne furono trovate alcune invase da una vegetazione fungina nerastra, abbondante, pulverulenta, invadente la spiga più o meno, e che, all'esame microscopico, si dimostrò essere dovuta a sviluppo di *Aspergillus niger*, v. Thieghem.

Il fatto risultava noto da tempo per gli studi condotti sulla eziologia della pellagra; e ad esso si attribuì molta importanza nella teoria tossica accennata dal Lombroso prima, (1) messa in seguito in valore dal Gosio (2) e dalla sua Scuola.

(1) Lombroso. *Trattato profilattico e clinico della pellagra*, 1892.

(2) Gosio. *Ricerche batteriologiche e chimiche sulle alterazioni del mais*. Riv. d'Igiene e Sanità pubblica, 1893 e 1896.

Allora, le azioni tossiche, vennero correlazionate alla presenza nelle cariossidi di Mais di varietà di *Pennicillium glaucum*, Link; e, intorno ad esso, si rivolsero sopratutto quelle prime indagini (3).

Più tardi però, un maggior valore pellagrogeno fu attribuito da Ceni (4) agli Aspergilli e più precisamente all'*Aspergillus fumigatus* Fres., e *flavescens* Wred.; ciò che fu confermato da Fossati (5) e dagli stessi Gosio e Ferrati (6) i quali isolarono da colture sporificate di *Asp. niger* sostanze di comportamento fenolico, tossiche più di quelle ottenute da *Pen. glaucum*.

L'ubiquitarietà di simili funghi e il fatto di essere essi associati, più o meno spesso, ad altri sistematicamente anche non vicini, fece sì che si estendessero molto le ricerche intorno alla flora ifomicetica presente nelle cariossidi di Mais guasto. Sono a ricordarsi, al riguardo, gli studi di Tiraboschi, il quale, in una prima Nota (7) passò in rassegna i gen. *Oospora*, *Aspergillus*, *Penicillium* descrivendo tra gli Aspergilli, *Asp. niger* v. Thieghem, *Asp. varians* Wehmer, *Asp. fumigatus* Fres.,

---

(3) Gosio e Ferrati. Idem, 1896.

— Ferrati. *Alcune ricerche sulla tossicità del mais invaso da* « Pennicillium glaucum ». Policlinico, VII, C. 1900.

— Ferrati e Antonini. Archivio di Psichiatria, ecc. 1903.

— Di Pietro. *Studio morfologico e biologico sul* « Pennicillium glaucum ». Teramo, 1904.

(4) Ceni. In Riv. Sp. di Freniatria, 1902-1903.

(5) Fossati. Boll. Soc. Medico-chirurgica di Pavia, 1904.

(6) Gosio e Ferrati. Loco citato, 1903.

(7) Tiraboschi, *Sopra alcuni ifomiceti del mais guasto di regioni pellagrose*. Ann. di Bot. II, 1905.

Asp. Flavus Link; e in una seconda ([8]) oltre questi, *Asp. ochraceus* Wiehelm, *Asp. ochr.* v. *microspora* Tiraboschi, *Asp. glaucus* Link.

Ed ancora altre volte, più recentemente, furono segnalate infezioni aspergilliche su cariossidi di granturco.

In Provincia di Macerata e in terreni piuttosto umidi, Ciferri ([9]) ne riscontrò anche al momento della raccolta. Egli relaziona l'attacco alle condizioni di umidità dei terreni o dell'ambiente, mentre che, pur verificatosi in cariossidi provenienti da piante coltivate in terreni asciutti ed elevati, lo crede dipendente da cause diverse tra cui la « screpolatura ». In ogni caso, l'azione del fungo si manifesta sui granuli d'amido che appaiono corrosi, forse, per un processo diastasico, e disorganizzati.

Il fatto, perciò, è noto, più o meno, nel senso del rinvenimento di vegetazioni fungine, aspergillari oltrechè penniciliari od altre, in cariossidi guaste di mais. Senonchè, nell'infezione di cui vien data notizia, le cariossidi non sono guaste od, almeno, lo divengono in conseguenza dell'attacco di cui la muffa è agente.

Non solo, ma per indagini eseguite nella Campagna Pi-

(8) Tiraboschi. *Ulteriori osservazioni sulle muffe del granturco guasto.* Id. VII, 1909.

(9) Ciferri. *Sul parassitismo secondario dell'* « Aspergillus varians » *Wehm. e un parassita di esso.* Riv. di Pat. Veg. I, 1921.

Ciferri. *Contributo allo studio dei micromiceti del Mais.* Bol. Soc. Bot. Ital. 1921. — (In questa nota l'A. riporta, oltre qualcuna delle opere citate, altra bibliografia relativa all'argomento).

sana risulterebbe altresì che l'infezione — all'opposto di quanto si è verificato nel nostro Campo sperimentale, in cui le pannocchie furono raccolte sane — verrebbe a determinarsi sulle pannocchie in pianta, il che assumerebbe valore di malattia vera e propria e, per il carattere diffuso e, potrebbe anche dirsi, epidemico, sarebbe di una gravità non trascurabile, qualora si consideri come, il mais così raccolto, non sia più atto alla mulinatura.

Si è creduto quindi opportuno di procedere allo studio colturale della forma agente e di tentare la riproduzione sperimentale della malattia, determinando le condizioni del suo attacco.

Prove colturali e caratteri morfologici

L'Aspergillus niger, ove più, ove meno, ha sviluppato e fruttificato su di ogni substrato con il quale fu cimentato, il che dà conferma del suo carattere di adattamento e ubiquitario messo in evidenza da Gibelli e Cesati, Monti e Tirelli, Gosio ([10]), Tiraboschi, Brizi, Ciferri, e altri, i quali lo rinvennero nelle cariossidi guaste di mais; da Saccardo che lo trovò sul pane umido, nell'orina, sulle foglie cadute, ecc.; dal Wehmer, sulle soluzioni zuccherine, sulle sostanze vegetali e nell'aria; e ancora da noi, che lo isolammo in occasione di altri studi dal terreno. Ciò non pertanto il suo sviluppo è in relazione alle

(10) Citati in Tiraboschi, op. cit.

diverse condizioni in cui si trova il mezzo e sopratutto alla natura del substrato.

Per rendersi conto di queste variazioni e per stabilire, oltre alle differenze colturali, quelle morfologiche, ad esse relative, si volle in primo luogo allevare il fungo sopra substrati liquidi aventi differente composizione, avuto particolare riguardo alla natura delle sorgenti azotata e carboidrata. Queste soluzioni, che prendono il nome di « costanti » o di « non costanti » qualora la loro composizione chimica sia definita e controllabile, oppur non, furono preparate secondo le norme fissate in « *Tecnica di Biologia Vegetale applicata all'Agricoltura* » da R. Perotti.

Furono cioè allestite, in quantità conveniente, queste diverse soluzioni e distribuite in piccole Erlenmeyer, entro le quali venne seminato l'Aspergillo in esame. Fu coltivato a 28° C. per 15 giorni osservando macroscopicamente lo sviluppo di cinque in cinque giorni e distinguendolo con i numeri 0 - 5 a seconda dell'intensità (0 = nessuno, 5 = massimo).

I risultati di queste osservazioni sono qui riassunti:

	Soluzioni	SORGENTE AZOTATA	SORGENTE CARBOIDRATA	AL 5° GIORNO		AL 10° GIORNO		AL 15° GIORNO	
				Sviluppo	Osservazioni	Sviluppo	Osservazioni	Sviluppo	Osservazioni
soluzioni costanti	1	asparagina	—	1	Assenza di fruttificazioni	1,5	id. al 5. giorno	1	come al 10° giorno.
	2	c. s.	glucosio	3,5	Frutt. abbondante	4	id. oss. precedente	4	
	3	c. s.	sacc. e glic.	3,5	Veget. abbond. e frutt. mediocre	3,5	c. s.	4	
	4	nitr. potas.	c. s.	4	Frutt. abbondante	4	c. s.	5	
	5	c. s.	glucosio	3	Sviluppo mediocre	4	c. s.	4	
	6	c. s.	glicerina	1	svil. scarsissimo; frutt. iniziale	1,5	frutt. mediocre	1,5	
	7	clor. amm.	glucosio	3	veget. abbondante frutt. mediocre	3	come al 5. giorno	3	
	8	c. s.	sacc e glicer.	3	c. s.	3	c. s.	4,5	
	9	tart. amm.	c. s.	2	Frutt. scarsa	2	c. s.	4	
	10	c. s.	glucosio	3,5	Frutt. abbondante	3,5	c. s.	3,5	
	11	latt. amm. e asparagina	—	1	Sv. scarsissimo e frutt. iniziale	1,5	frutt. mediocre	1,5	
soluz. non costanti	1	peptone	—	1	c. s.	2	c. s.	3	
	2	c. s. e mosto di birra	mannite	6	Frutt. abbondante	4	come al 5. giorno	5	
	3	pept. ed estr. di carne	saccarosio	4	c. s.	4,5	c. s.	5	
	4	c. s.	sacc. gluc.	3,5	c. s.	4	c. s.	5	
	5	pept., solfato am. nitr. pot.	—	2	Frutt. mediocre	3	c. s.	4	

Riepilogando, *Asp. niger* sembra utilizzare bene come sorgente di azoto, l'azoto dei peptoni, dei nitrati e amidico; in genere, cioè, molte forme di azoto, purchè accompagnate da adatta forma di carbonio.

Come sorgente di questo si mostrarono meglio utilizzati i carboidrati, meno gli alcool polivalenti.

Per avere un'idea più esatta sul modo come furono utilizzati i diversi alimenti, vennero prelevati i feltri fungini e essiccati a 110° C. fino a costanza di peso.

I risultati avuti furono:

	Soluzioni costanti											Soluz. non costanti				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	3	4	5
Peso delle membrane feltrose gr.	0.718	0.201	0.273	0.360	0.250	0.260	0.200	0.353	0.322	0.210	0.132	0.206	0.450	0.470	0.400	0.385
Facendo 100 la più picc. pesata	135	159	191	273	189	196	151	267	244	159	100	156	340	356	378	292

Apparve interessante controllare nei diversi liquidi le caratteristiche morfologiche relative al corpo vegetativo e agli elementi riproduttivi; il che fu eseguito al 10° giorno di coltura notando quanto appresso:

Soluzioni costanti

Soluzioni	Aspetto e dimensioni del micelio	Dimensioni delle ife fertili	Dimensioni delle spore	Osservazioni
I	Ife molto ramificate, con frequenti rigonfiamenti di μ 3 - 3,2	—	—	Assenza di fruttificaz.
II	Micelio ingrossato, vacuolizzato, ramificato, di μ 3,2 - 6,4	μ 9,6 12,8	μ 3,2	
III	Abbondanti ramificazioni. Filamenti di μ 3 - 3,5	μ 13 14	μ 3,2 3,5	
IV	Ramificazioni non frequenti; spessore del micelio: μ 3 - 3,5	μ 12,8	id	Abbondante fruttificaz.
V	Filamenti regolari ma sottili, di μ 3 - 3,2	μ 16	μ 3,2	
VI	c/s	μ 14 16	μ 3 3,2	
VII	Filamenti grandi, talvolta rigonfiati, di μ 4,8 - 6,2	μ 19,2 22,4	μ 3,2	
VIII	Ife regolari ma abbastanza grosse, di μ 3,2 - 5,4	μ 14 16	μ 3,2 3, »	Sporificazione mediocre.
IX	c/s	id	id	
X	Micelio regolare di μ 3,2 - 4,4	μ 12,8 16	μ 3,2	
XI	Micelio sottile, regolare, di μ 3 - 3,2	μ 11,2 12,8	μ 3,2	

Soluzioni non costanti

Soluzioni	Aspetto e dimensioni del micelio	Dimensioni delle ife fertili	Dimensioni delle spore	Osservazioni
I	Ife sottili di μ 3,2-regolari, leggermente vacuolizzate.	μ 12,8	μ 3,2	
II	Filamenti irregolari, in parte rigonfiati di μ 3,2 - 6,4.	μ 16	μ 3,2 3,5	
III	Micelio di μ 3,2 - 4,8, solo in parte ingrossato.	μ 12.8	μ 3,2	
IV	Ife ingrossate, irregolari, vacualizzate, di μ 3,8 - 6,2.	μ 12,8 14,4	id.	
V	Filamenti sottili, regolari, di μ 3,2.	μ 12,8 14,4	id.	

Al differente sviluppo corrisposero quindi anche i caratteri morfologici: relativi, particolarmente, alle dimensioni delle ife fertili e all'aspetto e alla forma del micelio, il quale mentre nelle soluzioni ordinarie e nei substrati ritenuti migliori si presenta non molto ramificato, con rarissimi rigonfiamenti e piuttosto sottile; nei liquidi cimentati esso assume forme irregolari più o meno tra loro diverse e riportabili fondamentalmente ai due tipi disegnati nella Fig. 1.

Fig. 1 — Sviluppo di micelio di *Asp. niger* in soluzioni nutritive di diversa composizione

In un tipo è sottile, ramificato più o meno, con setti abbastanza uniformemente distanziati; nell'altro è ingrossato in molti punti, vacuolizzato, con setti ravvicinati.

L'aspetto di questi due tipi di micelio alquanto diversi si discosta da quello che *Asp. niger* assume nel liquido di Raulin, in cui le ife miceliari si presentano regolari, di μ 3,5 - 4,8 di spessore, le ife fertili di μ 12,8 e le spore di μ 3,2 - 3,5 di grandezza.

Anche lo sviluppo quantitativo ne risulta molto diverso. Fu comparato, infatti, con tale sviluppo quello ottenuto per le soluzioni III e IV costanti e IV non costante, risultando che, fin dall'inizio della formazione del feltro in superficie ai liquidi, nel caso del substrato di Raulin, esso assumeva aspetto più rigoglioso. Tolti i feltri, al 15° giorno di coltura, essiccati a 110° C. fino a costanza di peso, si ottenne:

	Peso delle membrane feltrose gr.:	Facendo=100 più piccolo valore
Raulin	0.697	268
II costante	0,275	106
IV costante	0,275	100
IV non costante	0,480	185

*
* *

A complemento di queste ricerche sulla biologia di *Asp. niger,* il fungo fu coltivato su altri diversi substrati; ed il suo comportamento, qui si riassume:

— *Colture a striscio su agar - Raulin.* Sviluppo copioso di micelio, bianco all'inizio, poco dopo giallognolo, ben presto ricoprentesi di fruttificazioni abbondanti (Fig. 2-3).

Fig. 2 — Sviluppo di *Asp. niger* su liquido di Raulin agarizzato

— *Infissioni su agar - Raulin.* Sviluppo notevole in superficie sotto forma di coperta miceliare biancastra su cui sorgono le fruttificazioni: lungo il fittone sviluppo limitato di sottili ramificazioni partenti dal canale d'innesto. Con il tempo il substrato assume una colorazione giallo-bruna fino a divenire brunastro trascorsi due mesi di coltura.

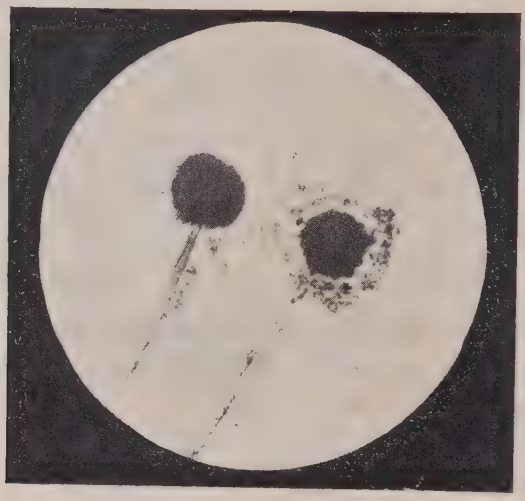

Fig. 3 — Microfotografia delle fruttificazioni di *Asp. niger* su liquido di Raulin agarizzato

— *Strisci e infissioni su agar-fagiuoli.* Caratteri analoghi ai precedenti: sviluppo più limitato.

— *Id., su agar peptone.* Sviluppo simile a quello dell'agar-fagiuoli.

— *Colture in liquido di Raulin, brodo di fagiuoli ed acqua di peptone.* Sviluppo di piccole colonie bianche in seno al liquido, quasi sempre aderenti in superficie, o al fondo del recipiente di coltura; formazione di micelio bianco o giallastro in superficie, alla quale poco dopo segue abbondante formazione di spore. Talvolta i liquidi di coltura mantengono il loro colore naturale; talaltra assumono colore giallognolo o brunastro.

— *Colture su carota* - Sviluppa abbondantemente.

— *Colture su patata* - Sviluppa pure molto bene.

— *Coltura in latte* - Sviluppo rigoglioso in superficie, sebbene lento; coagulazione dopo circa un mese di sviluppo. Secondo Tiraboschi (1) alla coagulazione del latte segue la dissoluzione del coagulo. Nelle nostre colture trascorsi quasi tre mesi il coagulo rimase non modificato.

— *Coltura in gelatina* - Il solito feltro in superficie e sottili ramificazioni radiali lungo il fittone. Fluidificazione lentissima.

— *Coltura su pappe di diverse farine* - Gli ultimi substrati provati furono alcune pappe allestite con acqua e farina di frumento, mais, riso, fagiuoli, patate, castagne. Si riempirono a metà recipienti cilindrici sterilizzati in corrente di vapore. Inoculati con ansate di Aspergillo, furono lasciati a temperatura ambiente (16 - 20° C.).

Al 7° giorno di coltura si ebbero già inizi di sviluppo, scarso su farina di grano e di patate, abbastanza buono sulle altre, particolarmente su castagne e fagiuoli, dove le colture si mostrarono fruttificate.

Al 15° giorno lo sviluppo progredì ovunque: si mantenne sempre inferiore nelle pappe di riso e patate ma la fruttificazione si verificò ad ogni modo.

Così al trentesimo giorno: la superficie dei substrati si mostrò completamente e abbondantemente invasa dal fungo in fruttificazione.

---

(11) Tiraboschi. Op. cit.

*
* *

Quanto si è cercato di porre in evidenza con le diverse prove di nutrizione dell'*Asp. niger,* su mezzi molto diversi e, taluni, di determinabile composizione, aveva per iscopo di fissare le peculiari esigenze del fungo, le quali avrebbero potuto mettere in luce le condizioni di attacco sulla pianta e la eventuale preferenza del fungo stesso per il Mais.

I principali risultati conseguiti non permettono di stabilire la netta prevalenza di un qualsiasi mezzo alimentare del fungo che possa giustificare un' ipotesi al riguardo.

L'attacco delle cariossidi di Mais, segnalato, deve quindi trovare piuttosto la sua spiegazione nelle condizioni estrinseche ambientali di sviluppo dell'*Asp. niger* e, cioè, umidità e temperatura od anche nella resistenza in rapporto o meno agli stadi vegetativi della pianta.

Si è proceduto perciò alla inoculazione artificiale del fungo su piante di granturco appositamente coltivate nel campo annesso al Laboratorio.

Lo sviluppo di queste fu regolare ed eccezionalmente favorito dalle frequenti e abbondanti piogge dei primi mesi di estate.

La inoculazione di *Asp. niger* fu eseguita contemporaneamente su diverse piante e in due epoche distinte.

Una prima, su spighe appena formate e in via di sviluppo; una seconda su spighe prossime alla maturazione.

Si era preveduto di lasciarne parte in condizioni naturali, parte in ambiente umido: ma il decorso della stagione di per sè piovoso ha dispensato da prendere siffatto provvedimento.

La maturazione avvenne regolarmente, ed anche nelle piante inoculate non era apparente, all'esterno, alcuna manifestazione patologica.

Però, una volta raccolte, le pannocchie inoculate si mostrarono più o meno attaccate.

In quelle corrispondenti alla prima inoculazione erano evidenti fenomeni di virescenza e di aborto (Confr. Tav. allegata); nelle altre il micelio, fruttificato, andava insinuandosi tra i meati delle cariossidi riproducendo la tipica infezione primariamente segnalata. In ogni caso, anche le brattee avvolgenti la spiga si mostrarono infette di vegetazioni aspergillari.

Dai Laboratori di Patologia e Batteriologia
del R. Istituto Superiore Agrario
Pisa, luglio 1930 - VIII.

PANNOCCHIA DI MAIS INFETTA DA ASP. NIGER.

ESEGUITE IN PANNOCCHIE APPENA FORMATE

ESEGUITE IN PANNOCCHIE IN VIA DI MATURAZIONE

INOCULAZIONI DI ASP. NIGER IN PIANTE SANE.